

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 15/40, 15/54, 5/10 A01H 5/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/11517 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: EP 513054 8. August 1991 (08.08.91)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP91/00130		(74) Gemeinsamer Vertreter: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT; Zentrale Patentabteilung, Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 24. Januar 1991 (24.01.91)		
(30) Prioritätsdaten: P 40 03 045.8 2. Februar 1990 (02.02.90) DE		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BB, BE (europäisches Patent), BF (OAPI Patent), BG, BJ (OAPI Patent), BR, CA, CF (OAPI Patent), CG (OAPI Patent), CH (europäisches Patent), CM (OAPI Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GA (OAPI Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, KP, KR, LK, LU (europäisches Patent), MC, MG, ML (OAPI Patent), MR (OAPI Patent), MW, NL (europäisches Patent), NO, RO, SD, SE (europäisches Patent), SN (OAPI Patent), SU, TD (OAPI Patent), TG (OAPI Patent), US.
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE).		
(72) Erfinder; und		Veröffentlicht
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>) : SCHNEIDER, Rudolf [DE/DE]; Feldbergstrasse 98, D-6233 Kelkheim (DE). DONN, Günter [DE/DE]; Sachsenring 35, D-6238 Hofheim am Taunus (DE). MÜLLNER, Hubert [DE/DE]; Staufenstrasse 1, D-6233 Kelkheim (DE).		<i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>

(54) Title: VIRUS/HERBICIDE RESISTANCE GENES PROCESS FOR PRODUCING SAME AND THEIR USE

(54) Bezeichnung: VIRUS/HERBIZIDRESISTENZ-GENE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract

Viral genes, for example "coat" protein genes, which reduce the corresponding virus infection symptoms or viral resistance, may be combined with herbicide resistance genes in order to transform plants. This combination makes it easier to select transgenic plants. In addition, in practical agricultural applications, plant vitality is increased thanks to viral tolerance and the herbicide resistance gene enables improved plant protection to be achieved.

(57) Zusammenfassung

Virusgene, z.B. "coat" Protein-Gene, die eine Reduzierung der entsprechenden Virus-Infektionssymptome oder Virusresistenz bewirken, können mit Herbizidresistenzgenen zur Transformation von Pflanzen kombiniert werden. Durch eine derartige Kombination wird die Selektion der transgenen Pflanzen erleichtert. Außerdem wird im praktischen Feldanbau die Vitalität der Pflanzen durch die Virustoleranz gesteigert und durch das Herbizidresistenzgen ein verbesserter Pflanzenschutz möglich.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	CN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	CR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Démocratique Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Beschreibung**Virus/Herbizidresistenz-Gene, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung**

Die Synthese von Virus "coat" Protein in Pflanzen führt zu einer verstärkten Resistenz der Pflanze gegenüber dem entsprechenden Virus. Die Europäische Patentanmeldung 0 240 331, beispielsweise, beschreibt die 5 Herstellung von Pflanzen-Zellen, die ein solches "coat" Protein enthalten.

Tumer et al. [EMBO J. 6, 1181 (1987)] haben die Transformation von Tabak- und Tomaten-Pflanzen mit einem 10 chimären Gen, das für das "coat" Protein des Alfalfa Mosaic Virus kodiert, durchgeführt. Die Nachkommen dieser transformierten Pflanzen zeigten eine signifikante Reduzierung der entsprechenden Virus-Infektionssymptome, in einigen Fällen sogar Virus-Resistenz.

15 Es wurde nun gefunden, daß solche Virusgene mit einem Herbizidresistenzgen kombiniert werden können, was die Selektion der transgenen Pflanzen erleichtert. Gleichzeitig wird im praktischen Feldanbau die Vitalität der Pflanzen durch die Virustoleranz gesteigert und durch das 20 Herbizidresistenzgen ein verbesserter Pflanzenschutz möglich. Es wurde allgemein beobachtet, daß die Herbizidapplikation einen stimulierenden Einfluß auf das Wachstum ausübt. Die erfundungsgemäß transformierte Pflanze 25 zeigt diesen Effekt verstärkt, wodurch ein verbesserter Pflanzertrag erreicht werden kann.

Herbizidresistenzgene sind bereits bekannt. In der Offenlegungsschrift DE 37 16 309 wird die Selektion nicht-pilzähnlicher Bakterien, die gegen Phosphinothricin 30 resistent sind, beschrieben. Aus der DNA dieser Selektanten kann das Phosphinothricin-Resistenzgen auf ein 2 kb großes Fragment eingegrenzt werden.

In der Deutschen Offenlegungsschrift 37 37 918 ist ein Weg zur Synthese des Phosphinothricin-Resistenzgens aus dem Genom von *Streptomyces viridochromogenes* aufgezeigt. Ein Einbau in Genstrukturen, mit Hilfe derer transformierte Pflanzen gegen das Herbizid resistant werden, wird dort ebenfalls beschrieben.

Die Erfindung betrifft somit ein Gen kodierend für eine Virusresistenz kombiniert mit einer Herbizidresistenz.

Im folgenden wird die Erfindung detailliert beschrieben, insbesondere in ihren bevorzugten Ausführungsformen. Ferner wird die Erfindung durch den Inhalt der Ansprüche bestimmt.

Die Gene für die Virusresistenz, insbesondere die Virus "coat" Proteine, kann man ausgehend von isolierter Virus RNA durch cDNA-Klonierung in Wirtsorganismen erhalten. Bevorzugt wird dabei von der RNA des Cucumber Mosaic Virus, des Alfalfa Mosaic Virus oder des Brom Mosaic Virus ausgegangen.

Herbizidresistenzgene können aus Bakterien, z.B. der Gattungen *Streptomyces* oder *Alcaligenes*, isoliert werden. Bevorzugt wird mit dem Phosphinothricinresistenzgen aus *Streptomyces viridochromogenes* (Wohlleben, W. et al., Gene 80, 25-57 (1988)) gearbeitet, das für eine Expression in Pflanzen entsprechend modifiziert werden kann.

Die Gene werden jeweils mit Hilfe der Vektoren pUC19, pUC18 oder pBluescript (Stratagene, Heidelberg, Product Information) kloniert und sequenziert.

Das Gen wird in einen intermediären Vektor mit Pflanzenpromotor kloniert. Derartige Vektoren sind beispielsweise die Plasmide pPCV701 (Velten J. et al., EMBO J. 3, 2723-2730 (1984)), pNCN (Fromm H. et al. PNAS 82, 5824-5826 (1985)), oder pNOS (an, G. et al., EMBO J. 4, 277-276 (1985)). Bevorzugt wird der Vektor pDH51 (Pietrzak,

M. et al., NAR 14, 5857, (1986)) mit einem 35S-Promotor, bzw. der Vektor pNCN mit einem Nos-Promotor verwendet.

Nach anschließender Transformation von E. coli, wie z.B.
5 E. coli MC 1061, DH1, DK1, GM48 oder XL-1, werden positive Klonen nach an sich bekannten Methoden (Maniatis et al., Lab. Manual), wie Plasmidminipräparation und Spaltung mit einem entsprechenden Restriktionsenzym, identifiziert.

10 Diese positiven Klonen werden dann zusammen in einen binären Pflanzenvektor subkloniert. Als Pflanzenvektor können pGV3850 (Zambrysk, P. et al., EMBO J. 2, 2143-2150 (1983)) oder pOCA18 (Olszewski, N., NAR 16, 10765-10782, (1988)) eingesetzt werden. Vorteilhaft wird mit pOCA18 gearbeitet.

15 Die erhaltenen binären Pflanzenvektoren, die Pflanzenpromotoren mit dem angehängten DNA-Fragment für die Expression von Virus Coat Protein und Phosphinhthicin Resistenz in der T-DNA enthalten, werden verwendet, um
20 Pflanzen zu transformieren. Dies kann durch Techniken wie Elektroporation oder Mikroinjektion erfolgen. Bevorzugt wird die Kokultivierung von Protoplasten oder die Transformation von Blattstückchen mit Agrobakterien angewandt. Dazu wird das Pflanzenvektorkonstrukt durch Transformation mit
25 gereinigter DNA oder, vermittelt über einen Helferstamm wie E. coli SM10 (Simon R. et al., Biotechnology 1, 784-791 (1983)) in Agrobakterium tumefaciens wie A282 mit einem Ti Plasmid über ein "triparental mating" transferiert. Direkte Transformation und tripental mating wurden, wie
30 in "Plant Molecular Biology Manual" (Kluwer Academic Publisher, Dordrecht (1988)) beschrieben, durchgeführt.

Es können grundsätzlich alle Pflanzen mit den die erfundungsgemäß konstruierte DNA tragenden binären Pflanzenvektoren transformiert werden. Bevorzugt sind dikotyledone Pflanzen, insbesondere Nutzpflanzen, die Stärke, Kohlenhydrate, Eiweiße oder Fette in nutzbaren

- Mengen in ihren Organen produzieren oder speichern oder die Obst und Gemüse produzieren oder die Gewürze, Fasern und technisch verwertbare Produkte oder Arzneimittel, Farbstoffe oder Wachse liefern und ebenfalls Futterpflanzen.
- 5 Als Beispiel sollen Tomate, Erdbeere, Avocado sowie Pflanzen, die tropische Früchte tragen, z.B. Papaya, Mango, aber auch Birne, Apfel, Nektarine, Aprikose oder Pfirsich genannt werden. Ferner sollen als zu transformierende Pflanzen beispielhaft alle Getreidearten, Raps, Rübsen... 10 angeführt werden. Die transformierten Zellen werden mit Hilfe eines Selektionsmediums selektiert, zu einem Kallus herangezüchtet und auf einem entsprechenden Medium zur Pflanze regeneriert (Shain M. et al., Theor. appl. Genet. 72, 770-770 (1986); Masson, J. et al., Plant Science 53, 15 167-176 (1987), Zhan X. et al., Plant Mol. Biol. 11, 551-559 (1988); McGranahan G. et al., Bio/Technology 6, 800-804 (1988); Novak F. J. et al., Bio/Technology 7, 154-159 (1989).
- 20 Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung.

Beispiele

25 1. Isolierung des Virus coat Protein Gens

Die Reinigung des Virus erfolgte nach einer modifizierten Methode von Lot, M. et al. Anual Phytopath. 4, 25-32 (1972). Luzerne wurden mit Alfalfa Mosaic Virus infiziert und nach 30 14 Tagen im gleichen Volumen 0,5 M Na-Citrat (pH 6,5)/ 5 mM EDTA/0,5 % Thioglykolsäure aufgeschlossen. Dann gab man 1 Volumen Chloroform hinzu und zentrifugierte 10 Min mit 12000 x g. Der Überstand wurde mit 10 % PEG 6000 (w/w) versetzt und über Nacht vorsichtig gerührt. Danach wurde 35 10 Min mit 12000 x g abzentrifugiert und in 50 ml 5 mM Na-Borat, 0,5 mM EDTA (pH 9) resuspendiert. Nach Zugabe von Triton-X-100 (2 % Endkonzentrationen) wurde 30 Min gerührt

und mit 19000 x g 15 Min abzentrifugiert. Das Virussediment wurde nach Zentrifugation mit 105000 x g 2 Std. in 5 mM Borat Puffer/0,5 mM EDTA (pH 9,0) aufgenommen und einer Saccharosezentrifugation (5-25 %) unterworfen.

5

Einzelne Fraktionen des Gradienten wurden auf einem Agarosegel analysiert, um den virushaltigen Bereich zu ermitteln. Die Virus RNA wurde durch Phenol/SDS Extraktion (Peden, K.W. et al., Virology 53, 487-492 (1973) von "coat" Protein gereinigt. Die Auftrennung der RNA-Komponenten erfolgte mit Hilfe von 2,8 % Polyacrylamid mit 40 mM Tris-acetatpuffer (pH 7,5) wie in Synous, R.H., Aust. J. Biol. Sci 31, 25-37 (1978) beschrieben. Die RNA wurde elektrophoretisch in Dialyseschläuchen aus dem Gel entfernt und gefällt.

10

15

20

25

30

cDNA Transkripte von RNA3 bzw. RNA4 wurden, wie in Langenreis, K. et al. Plant Mol. Biol. 6, 281-288 (1986) beschrieben, mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotidprimern mit 3'-komplementären Nukleotiden zum Template, die am 5'-Ende jeweils eine SmaI bzw. PstI Schnittstelle besaßen, hergestellt.

Die Reaktionen zur cDNA Synthese erfolgten nach den "Current Protocols in Mol. Biol." ed. Ausubel, F. et al., John Wiley and Sons.

Die cDNA wurde in den SmaI/PstI geschnittenen pUC 19 Vektor kloniert. Die Insertion konnte mit SmaI/HindIII wieder entfernt werden.

Die vorgehend beschriebene Methode kann ebenso für die Isolierung des CMV "coat" protein Gens angewendet werden.

2. Isolierung des Herbizidresistenz Gens

Es wurde ein Phosphinothricinresistenzgen mit folgender Sequenz nach der Phosphoamidit-Methode in einem Synthesizer synthetisiert.

	9	18	27	36	45
5'	GTC GAC ATG TCT CCG GAG AGG ABA CCA GTT GAG ATT AGG CCA GCT				
3'	G TAC AGA GGC CTC TCC TCT GGT CAA CTC TAA TCC GGT CGA				
5	54 63 72 81 90				
ACA GCA GCT GAT ATG GCC GCG GTT TGT GAT ATC GTT AAC CAT TAC					
TGT CGT CGA CTA TAC CGG CGC CAA ACA CTA TAB CAA TTG GTA ATG					
10	99 108 117 126 135				
ATT GAG ACG TCT ACA GTG AAC TTT AGG ACG GAG CCA CAA ACA CCA					
TAA CTC TBC AGA TGT CAC TTG AAA TCC TGT CTC GGT GTT TGT GGT					
144 153 162 171 180					
CAA GAG TGG ATT BAT GAT CTA GAG AGG TTG CAA GAT AGA TAC CCT					
GTT CTC ACC TAA CTA CTA GAT CTC TCC AAC GTT CTA TCT ATG GGA					
189 198 207 216 225					
15	TGG TTG GTT GCT GAG GTT GAG GGT GTT GTG GCT GGT ATT GCT TAC				
ACC AAC CAA CGA CTC CAA CTC CCA CAA CAC CGA CCA TAA CGA ATG					
234 243 252 261 270					
GCT GGG CCC TGG AAG GCT AGG AAC GCT TAC GAT TGG ACA GTT GAG					
CGA CCC GGG ACC TTC CGA TCC TTG CGA ATG CTA ACC TGT CAA CTC					
279 288 297 306 315					
AGT ACT GTT TAC GTG TCA CAT AGG CAT CAA AGG TTG GGC CTA GGA					
20	TCA TGA CAA ATG CAC AGT GTA TCC GTA GTT TCC AAC CCG GAT CCT				
324 333 342 351 360					
TCC ACA TTG TAC ACA CAT TTG CTT AAB TCT ATG GAG GCG CAA GGT					
AGG TGT AAC ATG TGT GTA AAC GAA TTC AGA TAC CTC CGC GTT CCA					
369 378 387 396 405					
TTT AAG TCT GTG GTT GCT GTT ATA GGC CTT CCA AAC GAT CCA TCT					
AAA TTC AGA CAC CAA CGA CAA TAT CCG GAA GGT TTG CTA GGT ABA					
414 423 432 441 450					
25	GTT AGG TTG CAT GAG GCT TTG GGA TAC ACA GCA CGG GGT ACA TTG				
CAA TCC AAC GTA CTC CGA AAC CCT ATG TGT CGG GCG CCA TGT AAC					
459 468 477 486 495					
CGC BCA GCT GGA TAC AAG CAT GGT GGA TGG CAT GAT GTT GGT TTT					
GCG CGT CGA CCT ATG TTC GTA CCA CCT ACC GTA CTA CAA CCA AAA					
504 513 522 531 540					
TGG CAA AGG GAT TTT GAG TTG CCA GCT CCT CCA AGG CCA GTT AGG					
30	ACC GTT TCC CTA AAA CTC AAC GGT CGA GGA GGT TCC GGT CAA TCC				
549 558					
CCA BTT ACC CAG ATC TGA G 3'					
GGT CAA TTG GTC TAG ACT CAG CTG 5'					

Es handelt sich hierbei um eine Modifikation der von
 35 Wohlleben in Gene 70, 25-37 (1988) veröffentlichten Sequenz
 für das Acetyltransferasegen.

Es ist ebenfalls möglich, eine genomische DNA-Bank aus dem von Wohlleben benutzten *Streptomyces viridochromogenes* in EMBL3 in *E. coli* auf Acetylierung von Phosphinothricin zu untersuchen. Das acetylierte Produkt kann sehr leicht
5 dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt werden.

Das Gen wurde in pUC19 kloniert und sequenziert. Die Expression in Pflanzen erfolgte als SalI-Fragment.

10 **3. Fusion Herbizidresistenzgen mit Nos Promotor**

Der Vektor pNCN wurde Bam/SalI verdaut und das entstehende 2,5 bp Stück isoliert. Die überstehenden Enden wurden mit Mung bean Nuclease abverdaut. Das Acetyltransferase Gen
15 wurde als 0,5 bp Stück nach SalI Verdau isoliert und mit Klenow aufgefüllt. Nach Ligase konnten positive Klone durch Plasmidminipräparationen isoliert werden. Die Orientierung ergab sich aus einem SalI/Bam Verdau.

20 **4. Fusion "coat" Protein Gen mit 35S Promotor**

Ein 0,5 Basenpaare langes Fragment aus pAI RNA3 (dem pUC19 Vektor mit "coat" Protein Gen Insert) wurde nach SmaI/Hind III Verdau isoliert. Die überstehenden Enden wurden durch
25 Mung bean Nuclease abverdaut. Der Vektor pDH 51 wurde mit XbaI geschnitten und die Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Fragment und Vektor wurden ligiert und in MC 1061 transformiert (p35/AI). Dieselbe Konstruktion wurde mit pCM RNA3 für das "coat" Protein von CMV geschaffen
30 (p35/CM).

5. Fusion von 35S/"coat" Protein Gen und nos/Acetyltransferase Gen

35 Ein 1,3 kb Stück aus dem 35S/"coat" Protein Konstrukt (p35/AI, p35/CM) wurde nach EcoRI Verdau aus einem "low

melt" Agarose Gel isoliert. Der Pflanzenvektor pOCA 18 wurde EcoRI verdaut und mit dem 1,3 kbp DNA Stück ligiert. Dieser pOCA/35 RNA3 Vektor wurde mit Klenow aufgefüllt. Ein 2,5 kbp Hind III Stück aus nos/AC wurde nach Klenow Behandlung der Enden in die aufgefüllte ClaI Stelle eingesetzt.

5 Konstruktionen: pOCA/AcAI3
pOCA/AcCM3

10

6. Transformation von Agrobakterien

Der Agrobakterienstamm pMP90RK wurde mit pOCA/AcAI3 bzw. pOCA/AcCM3 im triparental mating mit SM10 transformiert. Je 15 100 µl Bakterien aus Übernachtkulturen von SM10, die die Konstruktion tragenden MC 1061 und der Agrobakterien wurden abzentrifugiert und zusammen in 30 µl LB Medium suspendiert. Diese Zellen gab man auf ein kleines Rundfilter auf einer LB-Platte ohne Antibiotikum. Nach 20 12 Std. Inkubation bei 37°C wurde der Filter in 2,5 ml 10 mM MgCl₂ gewaschen und Aliquots davon auf LB-Platten mit Rifampicin, Tetrazyklin und Kanamycin selektiert. Positive Kolonien wurden durch Hybridisierung mit ³²P markierter DNA der Gene identifiziert.

25

7. Transformation von Luzerne

Zur Transformation der Luzerne wurde eine modifizierte Version der Kokultivierungsmethode nach Marton S. et al., 30 Nature 277, 129-130 (1979) eingesetzt. Etwa 1 cm lange Stengelabschnitte von sterilen Pflanzen wurden in Erlenmeyerkolben in 40 ml steriles MS Medium gegeben und 11 ml einer verdünnten Übernachtkultur der Agrobakterien (5 x 10⁷ Zellen/ml) zugegeben. Die Inkubation wurde 3 Tage 35 bei 25°C fortgesetzt. Die Stengelsegmente wusch man anschließend dreimal mit sterilem Wasser und brachte sie

auf MS-Medium mit 300 mg/l Carbamicillin und 100 mg/l Kanamycin. Nach 3 Wochen bildete sich ein Kallus, aus dem ganze Pflanzen regeneriert werden konnten.

5 8. Test der Pflanzen

Die Pflanzen zeigten nach Aufarbeitung von RNA und Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA der Gene Expression von AC-Gen mit Alfalfa Mosaic Virus "coat" 10 Protein Gen.

Die Pflanzen wuchsen auf phosphinothricinhaltigem Medium und zeigten deutliche Toleranz nach Infektion mit Alfalfa Mosaic Virus.

Patentansprüche

1. Gen kodierend für eine Virusresistenz kombiniert mit einer Herbizidresistenz.
- 5 2. Gen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es für ein Virus "coat" Protein kodiert.
- 10 3. Gen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der für die Virusresistenz verantwortliche Teil des Gens durch cDNA Klonierung ausgehend von der RNA des Cucumber Mosaic Virus, des Alfalfa Mosaic Virus oder des Brom Mosaic Virus erhältlich ist.
- 15 4. Gen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es für die Phosphinothricinresistenz kodiert.
5. Gen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß Phosphinothricinresistenzgen aus ... verwendet wird.
- 20 6. Wirtszelle enthaltend ein Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
- 25 7. Pflanzen, Pflanzenzellen sowie Teile oder Samen der Pflanzen enthaltend das Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 5.